



TITLE:

# 銀反応陽性細胞に関する研究: 腓ラ氏島細胞と亜鉛反応との関連性

AUTHOR(S):

中川, 正久

---

CITATION:

中川, 正久. 銀反応陽性細胞に関する研究: 腓ラ氏島細胞と亜鉛反応との関連性. 日本外科宝函 1981, 50(4): 580-588

ISSUE DATE:

1981-07-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208546>

RIGHT:

# 銀反応陽性細胞に関する研究： 膵ラ氏島細胞と亜鉛反応との関連性

京都大学医学部病理学教室（指導：翠川 修教授）

中 川 正 久

〔原稿受付：昭和56年5月11日〕

## Studies on Silver Reactive Cells: The Relation of Pancreatic Islet Cells to Zinc

MASAHISA NAKAGAWA

Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyoto University  
(Director: Prof. Dr. OSAMU MIDORIKAWA)

Although it is well known that A and B cells of pancreatic islet of mot animals contain zinc, histochemical studies on zinc in other islet cells such as D cells have been little reported.

The present studies were undertaken to investigate the relation of pancreatic islet cells to zinc by histochemical procedures.

Islet cells stained by one of the Grimelius, the Hellerström-Hellman silver method and the Gomori aldehyde-fuchsin stain were compared with those stained by the Voigt sulfide-silver method for zinc in the same sections of normal pancreas from several animals.

The following results were obtained in all animals examined.

- (1) Most of cells containing zinc are A and B cells.
- (2) D cells do not contain zinc.
- (3) In addition to D cells, there are a few cells which do not contain zinc.

Both glucagon and insulin contain histidine, and the presence of histidine has been regarded to be important for zinc binding. On the other hand, somatostatin lacks histidine, which may be one of the reasons why D cells do not contain zinc. Pancreatic polypeptide and VIP include histidine. Therefore, the presence of zinc in pp cells and D<sub>1</sub> cells should be considered. A few cells containing no zinc other than D cells may be the cells producing some hormones such as motilin, gastrin etc. including no histidine. Moreover, they may be reserve cells of the pancreatic islet.

---

Key words: Pancreatic islet, Argyrophil cell, Zinc, Histidine.

索引語：膵ラ氏島，好銀性細胞，亜鉛，ヒスチジン。

Present address: The First Department of Surgery, Shimane Medical University, Enya, Izumo, Shimane, 693, Japan.

## は じ め に

膵臓ランゲルハンス氏島(以下ラ氏島)には、現在少くとも A, B, D, PP ならびに D<sub>1</sub> 細胞の 5 種類の細胞が存在することが知られている<sup>7, 22, 40, 41</sup>。これら各細胞のうち、A 細胞からはグルカゴンが、B 細胞からはインスリンが産生分泌されていることは古くから判明していたが、最近 D 細胞がソマトスタチンを<sup>9, 11, 14, 34, 39</sup>、PP 細胞がパankレアチックポリペプチドを<sup>16, 23, 24, 35</sup>それぞれ産生分泌していることが明らかにされた。D<sub>1</sub> 細胞に関しては、VIP を産生分泌するという報告もあるが<sup>8</sup>、現在までのところその産生分泌するホルモンは明確にされていない。

このようなラ氏島各細胞に対する特殊染色法としては、従来より Gomori の Aldehyde Fuchsin Trichrome (以下 AFT) 染色<sup>15, 26</sup>、Grimelius 銀法<sup>18</sup>、Hellerström-Hellman 銀法<sup>21</sup> の 3 種類が最も広く用いられている。AFT 染色は、A, B および D 細胞を染め分けることが出来るが、特に Aldehyde Fuchsin によって染め出される B 細胞の染色性は特異的で、B 細胞中のインスリン量をよく反映するとみなされている<sup>12, 20</sup>。Grimelius 銀法では、従来 A 細胞が特異的に染色されるとみなされていたが、最近では A 細胞以外にも pp 細胞の一部ならびに D<sub>1</sub> 細胞も陽性所見を示すことが明らかにされた<sup>7, 11, 21, 22, 40, 41</sup>。これに対して、Hellerström-Hellman 銀法は D 細胞に特異的反応とみなされている。

一方、ラ氏島に亜鉛が存在することは古くから知られており、亜鉛のラ氏島内における局在に関する研究がなされてきたが、1966 年以降、Okamoto<sup>31</sup> および Pihl<sup>36, 37</sup> がそれぞれ別個に、Voigt の sulfide silver method<sup>47</sup> を電顕に応用して以来、ラ氏島構成細胞と亜鉛との関係に関する研究が急速に進展した。その結果、現在では多くの動物において、A, B 両細胞の分泌顆粒に一致して亜鉛が存在することが確認されている<sup>38</sup>。

しかし、D 細胞における亜鉛の存在の検討はまだまだ充分になされていない。また、光学顕微鏡レベルでラ氏島各細胞と亜鉛との関係を直接比較検討した研究成果は、いまだ報告されていない。

そこで著者は今回、Voigt の sulfide silver method とラ氏島に対する上記 3 種類の特殊染色とを、それぞれ同一パラフィン切片上で行ない、ラ氏島構成細胞、ことに D 細胞と亜鉛の関係を直接比較検討することを試みた。

## 研究材料および研究方法

ラット、ウサギ、イヌおよびヒトの膵臓を、H<sub>2</sub>S 飽和 70% アルコールで一昼夜固定したのち、70% アルコールで充分洗い、アルコール系列を通して脱水し、パラフィン包埋した。なお、ヒトの膵臓は比較的死後時間の短い剖検例を選んで用いた。

亜鉛染色は、Voigt の sulfide silver method<sup>47</sup> を施行した。ラ氏島に対する特殊染色法としては、B 細胞には AFT 染色を、A 細胞には Grimelius 銀法を、D 細胞には Hellerström-Hellman 銀法をそれぞれ用いた。

亜鉛染色と上記 3 種類の特殊染色を同一切片に施行し、同一切片の同一ラ氏島につき各構成細胞と亜鉛との関係を直接比較検討した。その手順の概要は次の如くである。

(1) H<sub>2</sub>S 飽和 70% アルコールで固定した膵臓の切片に Voigt の sulfide silver method を施行したのち、ラ氏島の顕微鏡写真を撮影する。

(2) 1% KCN 溶液にて亜鉛染色を脱色する<sup>18</sup>。

(3) 充分水洗したのち、Bouin 液で一昼夜再固定する。

(4) 同一切片上で行なう 2 度目の特殊染色として、次の 3 種の染色のうちの 1 つを施行する。

a) Gomori の Aldehyde Fuchsin Trichrome (AFT) 染色

b) Grimelius 銀法

c) Hellerström-Hellman 銀法

(5) (1) で写真撮影したものと同一のラ氏島を再び写真撮影し、亜鉛染色の結果と (4) の 3 種の特殊染色の結果とを、同一ラ氏島についてそれぞれ比較検討する。

## 結 果

## (1) 亜鉛染色所見

検索したすべての動物において、亜鉛染色陽性細胞の間で染色性に濃淡が認められ、特にラット、イヌにおいてその傾向が著しい。ラットではラ氏島周辺部の亜鉛染色陽性細胞が濃く染まり、中心部の細胞は淡く染まる。ラットのラ氏島においては、周辺部に A 細胞が、中心部に B 細胞が多いことから、亜鉛染色で濃く染まっているのが A 細胞、淡く染まっているのが B 細胞と考えられる。この所見は、A, B 両細胞における亜鉛の存在様式の違いあるいは固定液に対する両細胞の分泌顆粒の反応性の相異を示唆するものと考えられる。

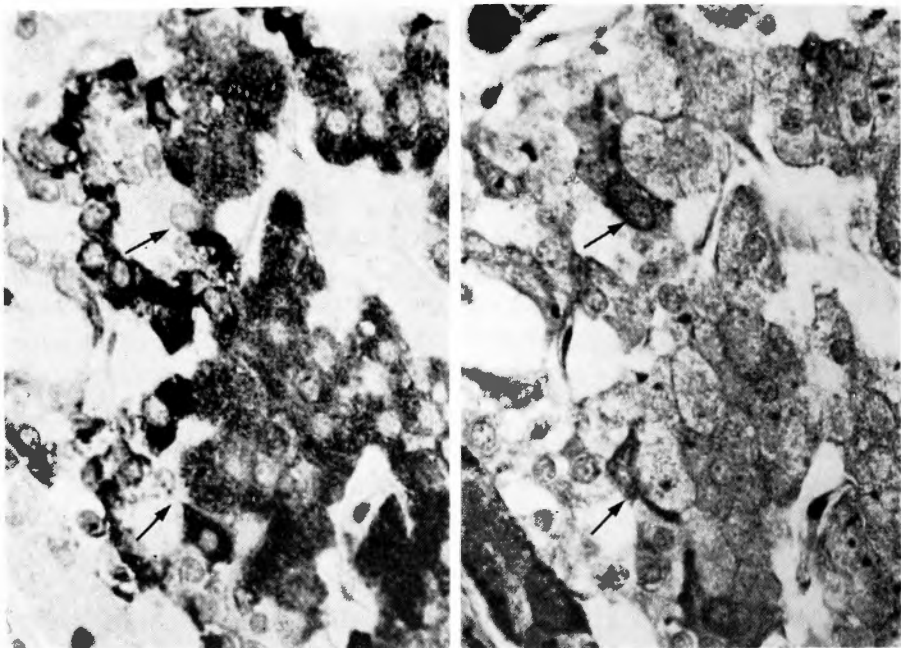


Fig. 1. ラット ラ氏島

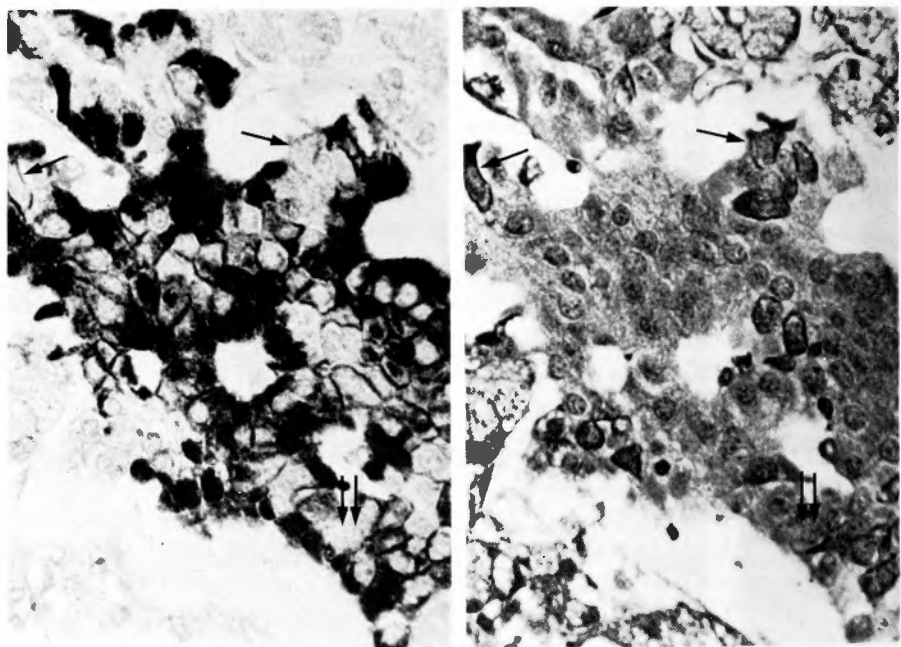


Fig. 2. ウサギ ラ氏島

亜鉛染色陰性細胞は、ラ氏島内に散在性に少数みられ、ことにラットではラ氏島周辺部の亜鉛染色強陽性細胞と中心部の亜鉛染色弱陽性細胞との境界部に認め

られる。

ラ氏島以外の膵外分泌部にも、亜鉛染色陽性細胞が極く少数みられるが、特にイヌでは比較的多く認めら

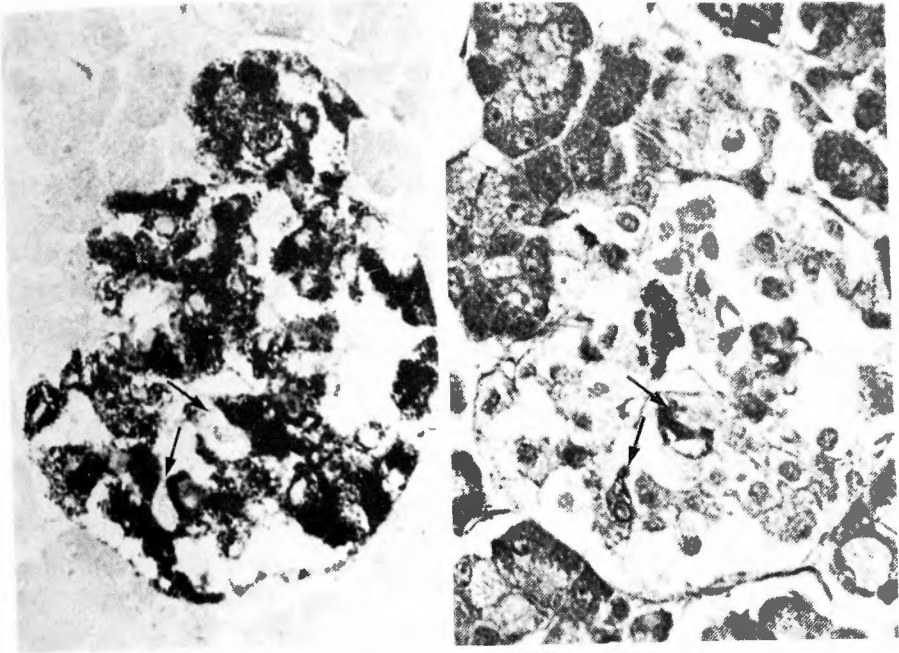


Fig. 3. イヌラ氏島

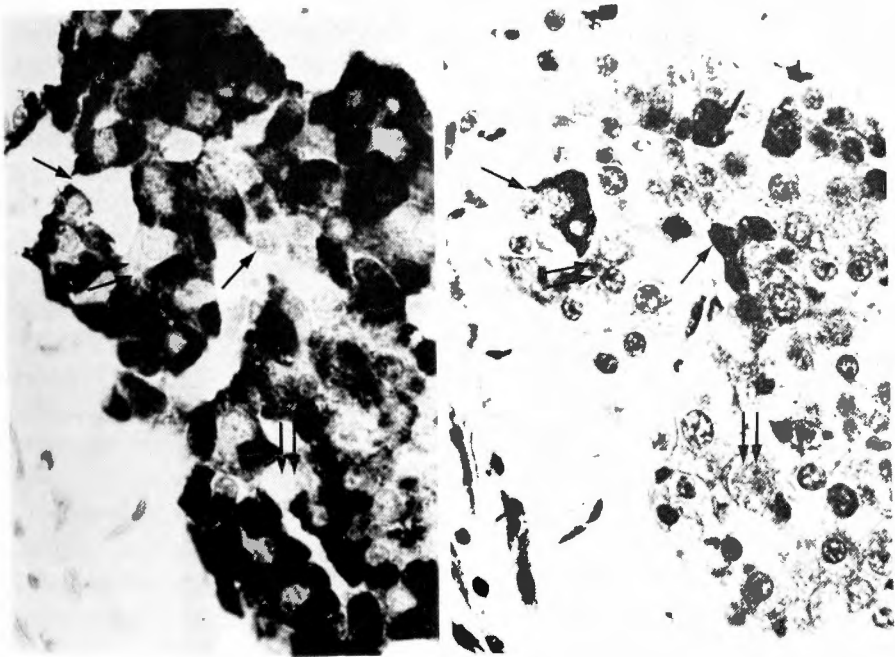


Fig. 4. ヒトラ氏島

亜鉛染色(左)と Hellerström-Hellman 銀法(右)

Hellerström-Hellman 銀法陽性細胞は亜鉛染色陰性である(→印)(Fig. 1~4). Hellerström-Hellman 銀法ならびに亜鉛染色がともに陰性の細胞(⇓印)も少数であるが認められる(Fig. 2, 4).

れる。

## (2) 亜鉛染色と AFT 染色所見

亜鉛染色を行なったのち、1% KCN 溶液で脱色した同一切片に AFT 染色を施行したが、Aldehyde Fuchsin に対する B 細胞の染色性ならびに Ponceau Fuchsin に対する A 細胞の染色性は著しく減弱し、A 及び B 細胞の同定はほとんど不可能であった。Light Green に対する D 細胞の染色性はわずかに保たれていたが、D 細胞と亜鉛との関係を明確にするにはこの方法では不充分であった。

なお、亜鉛染色および 1% KCN 溶液による脱色操作を施行していない H<sub>2</sub>S 飽和 70% アルコール固定の脾組織切片にも AFT 染色を行なったが、上記と同様に良好な結果はえられなかった。

## (3) 亜鉛染色と Grimelius 銀法所見

H<sub>2</sub>S 飽和 70% アルコールで固定した切片上では、亜鉛染色施行後脱色操作を行なったものでも、またそのような操作を加えない切片においても、Grimelius 銀法陽性細胞はまったく見出しえなかった。したがって、このような同一切片を用いた光顕の方法では、A 細胞と亜鉛の関係の比較検討はなしえなかった。

## (4) 亜鉛染色と Hellerström-Hellman 銀法所見

AFT 染色ならびに Grimelius 銀法と異なり、H<sub>2</sub>S 飽和 70% アルコールで固定された切片における Hellerström-Hellman 銀法の染色性は充分よく保たれており、D 細胞を明確に同定しえた。この Hellerström-Hellman 銀法の染色性は、亜鉛染色後脱色操作を行なったものでも充分保持されており、したがって亜鉛染色の結果と Hellerström-Hellman 銀法との結果を同一ラ氏島の同一細胞について直接比較検討することが可能であった。

その結果は、ラット、ウサギ、イスならびにヒトとも同様で次の如くである。

- a) Hellerström-Hellman 銀法陽性細胞はすべて亜鉛染色陰性である。(Fig. 1~4)
- b) 亜鉛染色陽性細胞はすべて Hellerström-Hellman 銀法陰性である。(Fig. 1~4)
- c) Hellerström-Hellman 銀法陰性かつ亜鉛染色陰性の細胞が極く少数であるが認められる。(Fig. 2, 4)

以上の結果より、ラ氏島 D 細胞には亜鉛が存在しないこと、また D 細胞以外にも極く少数の亜鉛染色陰性細胞が存在することを明確にしえた。

## 考 察

勝ラ氏島に対する特殊染色法である Aldehyde Fuchsin Trichrome 染色、Grimelius 銀法ならびに Hellerström-Hellman 銀法は、固定方法によりその結果に著しい差異が認められ、Bouin の固定液ないし中性ホルマリンで最も良好な結果がえられることが知られている。

H<sub>2</sub>S 飽和 70% アルコールで固定した組織では、AFT 染色による A および B 細胞の同定がほとんど不可能であり、Grimelius 銀法においても脾組織に陽性細胞を見出しえない。

純アルコール固定した脾組織においても、H<sub>2</sub>S 飽和 70% アルコール固定の場合と同様で AFT 染色、Grimelius 銀法とも良好な結果はえられない。

これらの固定液を用いた場合、AFT 染色、Grimelius 銀法で良好な結果がえられない原因としては、

- 1) アルコールによりとくに A 細胞、B 細胞の染色性に変化を来す。
- 2) A 細胞、B 細胞の分泌顆粒膜のアルコールに対する抵抗性が弱く、固定中に顆粒が流出してしまう、などの可能性が考えられるが詳細は明らかではない。

今回検索した 4 種の動物においては亜鉛染色陽性細胞の染色性に濃淡がみられ、A 細胞の方が B 細胞に比して濃く染まる傾向が認められた。この点に関しては、古くは A、B 両細胞の亜鉛含有量の差によるものと解釈され、濃く染まる A 細胞の方が淡く染まる B 細胞よりも亜鉛を多く含むとみなされていた。しかし、Pihl<sup>38)</sup> はラ氏島細胞の亜鉛に関する電顕的検索により、多くの動物において A 細胞よりもむしろ B 細胞に亜鉛反応が強いことを指摘し、亜鉛含有量は B 細胞の方が A 細胞よりも多いことを示した。Pihl は電顕的検索結果と光顕的所見との間に相異のみられる要因として、1) B 細胞の分泌顆粒膜の方が A 細胞の分泌顆粒膜よりもアルコールに対する抵抗性が弱く、そのため固定中に B 顆粒中の亜鉛が細胞外に分散流出しやすいため、2) B 顆粒と亜鉛の結合よりも A 顆粒と亜鉛の結合の方が強い、の 2 点の可能性をあげている。したがって、少なくとも光顕的な亜鉛染色の濃淡のみから亜鉛の細胞内濃度を論じるのは危険であると考えられる。

D 細胞は、1931年 Bloom<sup>9)</sup> により発見されたが、当初は A または B 細胞の未熟型、中間型ないし変性細胞などと考えられ、D 細胞の存在自体が疑問視されていた。1964年、Fujita<sup>13)</sup>、Epple<sup>10)</sup> がそれぞれ別個に

Hellerström-Hellman 銀法を用いてラ氏島を検索し、この銀法の陽性細胞が、A, B 細胞とは異なる別個の細胞であることを明らかにすると同時に、Hellerström-Hellman 銀法陽性細胞が D 細胞に他ならないことを示した。

その後、Lamsky<sup>28)</sup>, Greider<sup>17)</sup> は、螢光抗体法を用いて、Hellerström-Hellman 銀法陽性細胞すなわち D 細胞にガストリンが存在することを報告した。しかし、多くの研究者が D 細胞のガストリン産生説には疑問を持っていた<sup>9, 25, 27)</sup>。

1973年、Guillemin<sup>5)</sup> らにより、成長ホルモン放出抑制作用を有するホルモンとしてソマトスタチンがヒツジの視床下部より分離され、その生理作用が広く研究されてきた。以後、螢光抗体法<sup>9, 29, 33, 34)</sup> や radioimmunoassay<sup>1, 2)</sup> ないし生物学的検索法<sup>45)</sup> などにより、このソマトスタチンが消化管や膵にも存在することが示されるにいたり、D 細胞ガストリン産生説はさらに疑問視されるようになった。

1975年、Polak<sup>39)</sup> は、ソマトスタチンに対する螢光抗体法と Hellerström-Hellman 銀法を同一切片上で比較し、両者が完全に一致することを示した。さらにソマトスタチンのラ氏島内局在に関して電顕的免疫組織化学的検索も行なわれ、D 顆粒に一致してソマトスタチンの存在することが判明している<sup>14, 34)</sup>。現在ラ氏島においては、Hellerström-Hellman 銀法陽性の D 細胞がソマトスタチンを産生分泌することが広く認められている。

一方、ラ氏島に対する代表的な銀染色法である Grimelius 銀法と Hellerström-Hellman 銀法とは、同じく argyrophil reaction であるところから両銀法の特異性が議論されており、両者に重なりがある可能性を示唆する報告もある<sup>18)</sup>。しかしわれわれが同一切片上で検索した結果では、少なくともラ氏島においては両銀法は明らかに別個の細胞を染めており重なり合わないことが明らかになった。また電顕的検索においても、Grimelius 銀法の A 細胞に対する特異性は確かめられており<sup>46)</sup>、A 細胞の分泌顆粒に一致して銀反応が認められる。最近、pp 細胞の一部および D<sub>1</sub> 細胞も Grimelius 銀法で陽性所見を示すことが確かめられているが<sup>7, 11, 21, 22, 40, 41)</sup>、pp 細胞および D<sub>1</sub> 細胞の正常ラ氏島内における割合はそれぞれ 2% 以下であるといわれ、Grimelius 銀法陽性細胞のほとんど大部分は A 細胞であると考えられる。Hellerström-Hellman 銀法を用いたラ氏島の電顕的検索において、D 細胞以外にも

A 細胞および B 細胞の極く一部がときに陽性所見を示すが反応が微弱であるため、少なくとも光顕レベルにおいてはほとんど無視しうる所見であると考えられている。

したがって、Grimelius 銀法はグルカゴン産生細胞である A 細胞に、また Hellerström-Hellman 銀法はソマトスタチン産生細胞である D 細胞に、少なくとも光顕レベルではそれぞれ特異的な染色法であるといえる。

ラ氏島亜鉛の研究は、1942年 Okamoto<sup>32)</sup> が dithi-zone を用いてラ氏島内に亜鉛を組織化学的に証明して以来注目され、1958年 Timm<sup>44)</sup>、1959年 Voigt<sup>47)</sup> が亜鉛染色に sulfide silver method を用いてからはさらに多くの研究が進められた。その結果、モルモットなど 2, 3 の動物を除くほとんどすべての動物の A および B 細胞に亜鉛が存在することが示唆された。しかし、亜鉛染色とラ氏島細胞に対する特殊染色とを同時に行なう方法がなく、各ラ氏島構成細胞と亜鉛との直接的な関係を証明することは困難であった。

1966年以降、Okamoto<sup>31)</sup>、Pihl<sup>36, 37)</sup> らは Voigt の sulfide silver method を電顕的検索に応用し、A, B 両細胞の分泌顆粒に一致して亜鉛が認められることを証明するとともに、両細胞の分泌顆粒と亜鉛との関係を詳細に検討した。

B 細胞と亜鉛の関係は、ブドウ糖やアドレナリン投与により B 細胞内の亜鉛が減少し、飢餓時には増加するなど、亜鉛の動態がインスリンのそれとよく平行することが知られている<sup>30, 49, 50)</sup>。現在、B 細胞内亜鉛はインスリンと結合して顆粒中に貯蔵型として存在し、血糖が高くなると亜鉛とインスリンの結合がはずれてインスリンは分泌型となるものと考えられている。

A 細胞と亜鉛の関係に関しては、高血糖時やアドレナリン投与時に B 細胞と同様 A 細胞内亜鉛も減少し、飢餓時には増加するなど、グルカゴンの動態とは必ずしも結びつかず、現在なお A 細胞内亜鉛の機能ないし存在意義は不明である<sup>48, 49)</sup>。

ラ氏島内亜鉛の研究の多くは、A, B 両細胞に限られ、D 細胞と亜鉛の関係に関する研究は極めて少ない。A, B 両細胞にくらべ、D 細胞の産生ホルモンが最近まで確定していなかったこともその原因の 1 つと考えられる。

今回、著者は同一切片を用いた光顕的検索により、D 細胞には亜鉛が存在しないことを明らかにした。しかし、ラ氏島を構成する細胞のうち、A および B 細胞には亜鉛が存在し、D 細胞に亜鉛が存在しない理由は



いまだ明確にされていない。おそらくA, B, D各細胞の産生するホルモンないし顆粒を構成する物質の化学的性状の差異に起因するものと考えられる。

インスリンはA, B 2つのchainで構成されているが、B chainに2個のhistidineを持ち、特にB10の位置のhistidineが亜鉛との結合に重要であるといわれる<sup>4)</sup>。モルモット、コイプーのラ氏島B細胞には亜鉛が存在しないが<sup>38)</sup>、これら動物のインスリンにはB10の位置にhistidineが存在せず<sup>42, 43)</sup>、このことがモルモットおよびコイプーのB細胞に亜鉛が存在しない大きな理由と考えられる。

一方、グルカゴンはその1分子中に1個のhistidineを持っており、A細胞に亜鉛が存在するのはhistidineとの関連が深いとみなされている<sup>31)</sup>。しかし、ソマトスタチンの分子中にはhistidineが存在しない。したがって、このhistidineを持たないことがD細胞に亜鉛が存在しないことの最も大きな理由の1つとも考えられる。

しかし、ラ氏島の各種ホルモンの化学的性状と亜鉛の存在との関連性は、詳細にはいまだ不明である。

なお、pp細胞およびD<sub>1</sub>細胞と亜鉛に関する研究報告は今までのところ皆無であり、著者の検索においても明らかにしえなかった。しかし、パンクレアチックポリペプチドはその1分子中に1個のhistidineを持っており、このことを考慮すれば、pp細胞には亜鉛が存在する可能性が高い。またpp細胞はラ氏島内ばかりでなく膵外分泌部にも散在性に存在することが知られており<sup>11, 14, 34)</sup>、亜鉛染色で外分泌部に少数認められた亜鉛染色陽性の細胞がpp細胞である可能性ももたれる。

D<sub>1</sub>細胞の産生分泌するホルモンは現在なお明確にされていないが、VIPを産生分泌しているという報告もある<sup>9)</sup>。もしD<sub>1</sub>細胞がVIPを産生分泌しているとすれば、VIPはその1分子中に1個のhistidineを持ち、グルカゴンとアミノ酸構成がよく似ている点から、A細胞同様D<sub>1</sub>細胞にも亜鉛が存在する可能性もたれる。

一方、ラ氏島に極く少数みとめられたHellerström-Hellman銀法ならびに亜鉛染色がともに陰性の細胞がどのような性質の細胞であるかは不明であるが、histidineを持たないホルモン、たとえばモチリン、 $\beta$ -エンドルフィンなどを産生分泌している細胞である可能性もあるし、さらにラ氏島細胞のいわゆるreserve cellである可能性もまったく否定はできない。とくに

ガストリン産生細胞の可能性も考えられ、今後この点についての研究が望まれる。

## ま と め

膵ラ氏島構成細胞のうち、多くの動物においてAおよびB細胞に亜鉛が存在することが確認されているが、D細胞をはじめその他の構成細胞と亜鉛の関係はいまだ明確にされていない。今回著者は、Voigtの亜鉛染色とラ氏島に対する3種類の特殊染色(AFT染色、Grimelius銀法、Hellerström-Hellman銀法)とを、それぞれ同一切片上で行ない、ラ氏島構成細胞と亜鉛の関係を直接比較検討した。その結果、次の結論をえた。

(1) 亜鉛陽性細胞の大部分は、AおよびB細胞に相当するものとみなされる。

(2) D細胞には亜鉛は存在しない。

(3) D細胞以外に亜鉛反応陰性の細胞が極く少数であるが認められる。

AおよびB細胞に亜鉛が存在する1つの理由として、グルカゴンおよびインスリン分子中にhistidineが存在することが重要視されている。一方、ソマトスタチンはhistidineを持たず、このことがD細胞に亜鉛が存在しない理由の1つと考えられる。

なお、パンクレアチックポリペプチドおよびVIP分子中にはhistidineが含まれており、したがってpp細胞およびD<sub>1</sub>細胞には亜鉛が存在する可能性が推測される。

また、D細胞以外に極く少数みとめられた亜鉛陰性細胞は、モチリン、ガストリンなどhistidineを持たないホルモンを産生している細胞ないしはラ氏島細胞のreserve cellである可能性が考えられる。

稿を終るにあたり、懇篤な御指導と御校閲を賜りました京都大学医学部病理学教室翠川 修教授、京都大学医療技術短期大学部高橋清之助教授に深甚なる感謝の意を表します。また、御鞭撻を頂いた島根医科大学第1外科学教室中瀬 明教授、種々御協力頂いた京都大学医学部病理学教室員各位に深く感謝の意を表します。

## 参 考 文 献

- 1) Arimura A, Sato H, et al: Abundance of immunoreactive GH-release inhibiting hormone in the stomach and the pancreas of rat. *Fed Proc* **34**(Abst.): 273, 1975.
- 2) Arimura A, Sato H, et al: Somatostatin: Abundance of immunoreactive hormone in the rat stomach and pancreas. *Science* **189**: 1007-1009, 1975.



- 3) Bloom W: A new type of granular cell in the islets of Langerhans of man. *Anat Rec* **49**: 363-371, 1931.
- 4) Blundell TL, Dodson GG, et al: X-ray analysis and structure of insulin. *Rec Prog Horm Res* **27**: 1-40, 1971.
- 5) Brazeau P, Vale W, et al: Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* **179**: 77-79, 1973.
- 6) Buffa R, Capella C, et al: Vasoactive intestinal peptide (VIP) cells in the pancreas and gastrointestinal mucosa. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Histochemistry* **50**: 217-227, 1977.
- 7) Capella C, Solcia E, et al: The endocrine cells of the pancreas and related tumors. Ultrastructural study and classification. *Virchows Arch A Pathol Anat* **373**: 327-352, 1977.
- 8) Creutzfeldt W: Pancreatic endocrine tumors—the riddle of their origin and hormone secretion. *Israel J Med Sci* **11**: 762-776, 1975.
- 9) Dubois MP: Immunoreactive somatostatin is present in discrete cells of the endocrine pancreas. *Proc Nat Acad Sci (USA)* **72**: 1340-1343, 1975.
- 10) Epplé A: Zur vergleichenden Zytologie des Inselorgans. *Zool Anz* **27**: 461-470, 1964.
- 11) Erlandsen SL, Hegre OD, et al: Pancreatic islet cell hormones; distribution of cell types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within the D-cell. *J Histochem Cytochem* **24**: 883-897, 1976.
- 12) Fujita T, Hasegawa H, et al: Is it insulin that is stained by aldehyde fuchsin and pseudocyanin in the sections of the pancreas? *Arch Histol Jap* **29**: 313-325, 1968.
- 13) Fujita T: The identification of the argyrophil cells of pancreatic islets with D-cells. *Arch Histol Jap* **25**: 189-197, 1964.
- 14) Goldsmith PC, Rose JC, et al: Ultrastructural localization of somatostatin in pancreatic islets of the rats. *Endocrinology* **97**: 1061-1064, 1975.
- 15) Gomori G: Aldehyde-Fuchsin; a new stain for elastic tissue. *Am J Clin Pathol* **20**: 665-666, 1950.
- 16) Greider MH, Gersell DJ, et al: Ultrastructural localization of pancreatic polypeptide in the F cell of the dog pancreas. *J Histochem Cytochem* **26**: 1103-1108, 1978.
- 17) Greider MH and McGuigan JE: Cellular localization of gastrin in the human pancreas. *Diabetes* **20**: 387-396, 1971.
- 18) Grimelius L: A silver nitrate stain for  $\alpha_2$  cells in human pancreatic islets. *Acta Soc Med Upsal* **73**: 243-270, 1968.
- 19) Grimelius L and Strand A: Ultrastructural studies of the argyrophil reaction in  $\alpha_1$  cells in human pancreatic islets. *Virchows Arch A Pathol Anat* **364**: 129-135, 1974.
- 20) Hartroft WS and Wrenshall GA: Correlation of beta-cell granulation with extractable insulin of the pancreas. *Diabetes* **4**: 1-7, 1955.
- 21) Hellerström C and Hellman B: Some aspects of silver impregnation of the islets of Langerhans in the rat. *Acta Endocrinol* **35**: 518-532, 1960.
- 22) Larsson LI: Endocrine pancreatic tumors. *Hum Pathol* **9**: 401-416, 1978.
- 23) Larsson LI, Sundler F, et al: Immunochemical localization of human pancreatic polypeptide (HPP) to a population of islet cells. *Cell Tissue Res* **156**: 167-171, 1975.
- 24) Larsson LI, Sundler F, et al: Pancreatic polypeptide. A postulated new hormone; identification of its cellular stage by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Diabetologia* **12**: 211-226, 1976.
- 25) Larson LI, Hakanson R, et al: Fluorescence histochemistry of the gastrin cell in fetal and adult man. *Gastroenterology* **68**: 1152-1159, 1975.
- 26) Lazarus SS and Volk BW: The pancreas in human and experimental diabetes. New York, London, Grune & Stratton, 1962, p. 261-262.
- 27) Lotstra F, Van der Loo W, et al: Are gastrin cells present in mammalian pancreatic islets? *Diabetologia* **10**: 291-302, 1974.
- 28) Lowsky R, Langr F, et al: Immunohistochemical demonstration of gastrin in mammalian islets of Langerhans. *Nature* **223**: 618-619, 1969.
- 29) Luft R, Effenic S, et al: Immunohistochemical evidence for the localization of somatostatin-like immunoreactivity in a cell population of the pancreatic islets. *Med Biol* **52**: 428-430, 1974.
- 30) Maske H: Beobachtungen über das Zink in den Langerhanschen Inseln des Pankreas und seine Beziehungen Zur Inseln-funktion. *Z Naturforsch* **8**: 96-104, 1953.
- 31) Okamoto K and Kawanishi H: Submicroscopic histochemical demonstration of intracellular reactive zinc in  $\beta$ -cells of pancreatic islets. *Endocrinol Jap* **13**: 305-318, 1966.
- 32) Okamoto K: Biologische Untersuchungen der Metalle. VI. Mitterilung. Histochemischer Nachweis einiger Metalle in den Geweben, besonders in den Nieren, und deren Veränderungen. *Tr Soc Pathol Jap* **32**: 99-105, 1942.
- 33) Orci L, Baetens M, et al: Evidence for the D-cell of the pancreas secreting somatostatin. *Horm Metab Res* **7**: 400-402, 1975.
- 34) Pelletier G, Le Clerc R, et al: Immunocytochem-

- ical localization of somatostatin in the rat pancreas. *J Histochem Cytochem* **23**: 699-701, 1975.
- 35) Pelletier G and LeClerc R: Immunohistochemical localization of human pancreatic polypeptide (HPP) in the human endocrine pancreas. *Gastroenterology* **72**: 569-571, 1977.
  - 36) Pihl E and Falkmer S: Trials to modify the sulfide-silver method for ultrastructural tissue localization of heavy metals. *Acta Histochem* **27**: 34-41, 1967.
  - 37) Pihl E: Ultrastructural localization of heavy metals by a modified sulfide-silver method. *Histochemie* **10**: 126-139, 1967.
  - 38) Pihl E: An ultrastructural study of the distribution of heavy metals in the pancreatic islets as revealed by the sulfide silver method. *Acta Pathol et Microbiol Scandinav* **74**: 145-160, 1968.
  - 39) Polak JM, Pearse AGE, et al: Growth-hormone release-inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cells. *Lancet I*: 1220-1222, 1975.
  - 40) Solcia E, Polak JM, et al: Lausanne 1977 classification of gastroenteropancreatic (GEP) endocrine cells. In *Gut Hormones* edited by Bloom SR, Edinburgh, Churchill-Livingstone, 1978, p. 40-48.
  - 41) Solcia E, Capella C, et al: Endocrine cells of the gut and related growths: recent developments and classification. In *Gut Hormones* edited by Bloom SR, Edinburgh, Churchill-Livingstone, 1978, p. 77-81.
  - 42) Smith LF: Species variation in the amino acid sequence of insulin. *Am J Med* **40**: 662-666, 1966.
  - 43) Smith LF: Amino acid sequences of insulins. *Diabetes* **21**(Suppl. 2): 457-460, 1972.
  - 44) Timm F: Zur Histochemie der Schwermetalle. Das Sulfid-Silberverfahren. *Dtsch Z Gerichtl Med* **46**: 706-711, 1958.
  - 45) Vale W, Braseau P, et al: Somatostatin. *Rec Progr Horm Res* **31**: 365-397, 1975.
  - 46) Vassallo G, Capella C, et al: Grimelius' silver stain for endocrine cell granules, as shown by electron microscopy. *Stain Technol* **46**: 7-13, 1971.
  - 47) Voigt GE: Untersuchungen mit der Sulfidsilbermethode an menschlichen und tierischen Bauchspeicherdrüsen. (unter besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus und experimenteller Metallvergiftungen). *Virchows Arch A Pathol Anat* **332**: 295-323, 1959.
  - 48) Weiss I: Untersuchungen zur Frage der zentralnervösen Regulation der A-Zellfunktion am pankreas der Albinoratte. I. Das Verhalten des A-Zellzinks der Ratte nach Adrenektomie und Insulinbelastung. *Endokrinologie* **47**: 183-192, 1965.
  - 49) Wolff H and Ringlet D: Histochemische Untersuchungen über das Inselzink. *Z Ges Exp Med* **124**: 236-256, 1954.
  - 50) Wolff H, Ringlet D, et al: Histochemische Untersuchungen über das Inselzink (II. Histo-photometrische Messungen). *Z Ges Exp Med* **126**: 390-416, 1955.